Ministère de l'Agriculture , de l'Alimenation, de la Pêche et des Affaires rurales
Direction Générale de l'Alimentation
Sous Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Végétal : pomme de terre

(*Solanum tuberosum*),

détection de virus et phytoplasmes

par la technique sérologique

ELISA

Réf.: Méthode **VH●/02/04 version a**

LNPV Station de Quarantaine de la Pomme de terre de Rennes - Le Rheu
La Motte au Vicomte
35650 LE RHEU
Tél. : 02.23.48.51.15

VEGETAL : POMME DE TERRE (*Solanum tuberosum*), DETECTION DE VIRUS ET PHYTOPLASMES PAR LA TECHNIQUE SEROLOGIQUE ELISA

Sommaire

Avertissement et précautions de sécurité 3
0. Introduction 3
1. Objet 3
2. Domaine d'application 3
3. Définitions 3
4. Réactifs, produits et consommables 4
5. Appareillage 4
6. Échantillons 5
6.1. Réception et stockage des échantillons 5
6.2. Préparation de l'échantillon pour analyse 5
6.3. Broyage 6
7. Mode opératoire 8
7.1. Echantillons de référence 8
7.2. Le plan de plaque 8
7.3. Déroulement du test 8
8. Validation et interprétation des résultats 9
9. Expression des résultats 9
10. Modalités de transmission au laboratoire de confirmation 9
11. Désinfection et destruction des déchets d'analyse 10
12. Annexes 10
Annexe I : Listes des virus et phytoplasmes de Quarantaine répertoriés par l'Union Européenne et l'OEPP, liste des organismes européens dits de Qualité et liste des virus et phytoplasmes répertoriés par la FAO/IPGRI……..... 11
Annexe II : Composition des tampons 13
Annexes III : Préparation de solutions d'alcool et d'eau de Javel au degré souhaité..... 14
Annexe V : Préparation de la solution d'acide gibbérellique 0,03 mM 15
Annexe VI : Exigences relatives aux locaux de stockage des échantillons qui sont en cours d'analyse 15
Annexe VII : Plan de plaques : exemples 16

VEGETAL : POMME DE TERRE (*Solanum tuberosum*),

DETECTION DE VIRUS ET PHYTOPLASMES

PAR LA TECHNIQUE SEROLOGIQUE ELISA

Avertissements et précautions de sécurité

Les phytopathogènes ne présentant aucun caractère de pouvoir pathogène pour l'homme, les précautions à prendre lors de leur manipulation pourront se limiter au respect des consignes générales de protection, dont l'application doit permettre d'éviter la dissémination d'agents phytopathogènes dans l'environnement.

Ainsi, comme pour toute autre manipulation d'organismes phytopathogènes, on veillera à inactiver ceux présents dans les végétaux, extraits végétaux, supports de culture, effluents liquides, par une procédure appropriée (destruction chimique ou chaleur) avant de les rejeter.

0. Introduction

Cette méthode est directement liée à la **"Directive Générale - Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés"** (référence **DG1/98/ a**) qui est disponible au Laboratoire de référence. Ces deux documents sont complémentaires. La méthode ne peut être appliquée qu'en respectant la directive générale.

Cette méthode, uniquement qualitative, permet de trier les échantillons, c'est-à-dire de séparer ceux qui ne sont pas contaminés ou pour lesquels la contamination est inférieure au seuil de détection de la technique, de ceux qui sont susceptibles d'être contaminés par le virus.
Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés. Une analyse complémentaire peut être réalisée en particulier lorsqu'il s'agit d'organismes de quarantaine (voir Annexe VII).

1. Objet

La présente méthode permet la détection des virus et des phytoplasmes de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), pour lesquels il existe des réactifs sérologiques spécifiques au virus ou au phytoplasme recherché notamment ceux de quarantaine répertoriés par l'Union Européenne et l'OEPP, ainsi que les virus de la pomme de terre dits de qualité et les virus et phytoplasmes répertoriés par la FAO/IPGRI (cf. liste en annexe I).
Elle est utilisable, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires réglementaires pour ces organismes, en surveillance du territoire, à l'importation et à l'exportation ainsi que dans le cadre de la certification du plant de pomme de terre.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique à des végétaux présentant ou non des symptômes de la maladie, principalement aux organes aériens de la pomme de terre (tissus foliaires). L'analyse directe des tubercules ou des germes peut s'avérer nécessaire pour certains virus.

3. Définitions

⇨ **Souches non-européennes des virus européens de la pomme de terre :** l'origine géographique du matériel contaminé est à considérer s'il n'existe aucun autre moyen technique reconnu de vérifier le caractère non européen de la souche.

⇨ **Groupage :** prise d'analyse rassemblant plusieurs unités du même "échantillon pour laboratoire".

4. Réactifs, produits et consommables

4.1. Réactifs et consommables

4.1.1. Choix des réactifs sérologiques

Utiliser des réactifs spécifiques.
Un conseil pour le choix du fournisseur de réactifs sérologiques (cf. Directive Générale - § 0. Introduction) peut être apporté, notamment, par le Laboratoire de référence pour les parasites de quarantaine.

4.1.2. Conservation : suivre les consignes des fournisseurs des réactifs.

4.2. Tampons

Composition et préparation des tampons : voir annexe II.

4.2.1. Tampon de rinçage PBS-Tween
4.2.2. Tampon de coating = tampon de fixation des anticorps
4.2.3. Tampon d'extraction (de broyage)
4.2.4. Tampon de conjugué
4.2.5. Tampon de substrat

Conservation : conserver les solutions 1X (tampons sans azide de sodium) 1 mois à 5°C ± 4°C et les solutions 1X (tampons avec azide de sodium) 3 mois à 5°C ± 4°C. Des solutions stock concentrées peuvent être préparées et sont conservées au maximum 6 mois à température ambiante.

4.3. Autres consommables

4.3.1. Éthanol à 70° (modifié ou non) (cf. annexe III) et à 96° (non dénaturé) **[produits inflammables, à tenir éloignés des sources de chaleur et des flammes nues].**
4.3.2. Eau courante.
4.3.3. Eau permutée ou distillée.
4.3.4. Éventuellement, détergent (p. ex. DDN 50 ou MIR ^{TM}) et désinfectant (p. ex. eau de Javel à 1° chlorométrique) (cf. annexe III).
4.3.5. Solution d'acide gibbérellique 0,003 mM (voir préparation en annexe IV).
4.3.6. Plaques de microtitration à fond plat NUNC IMMUNO ou tout autre type de plaque assurant une qualité de réaction équivalente.
4.3.7. Couvercles de plaques de microtitration ou couvercles adhésifs.

5. Appareillage

Appareillage courant dans un laboratoire de virologie, notamment :
* matériel faisant déjà partie de la liste de la Directive Générale ELISA

➢ **Petit matériel**

5.1. Outil de prélèvement : scalpel + lames jetables, couteau ou cuillère à melon.
5.2. Flaconnages plastiques divers.
5.3. Pissettes.
5.4. Pipettes et cônes adaptées.*

➢ **Gros matériel**

5.5. Chambre climatisée ou serre.
5.6. Système de production d'eau permutée ou d'eau distillée.*
5.7. Balance de précision et pH-mètre.*
5.8. Réfrigérateur, congélateur et incubateur.*
5.9. Système de lavage des plaques de microtitration manuel, semi-automatique ou éventuellement automatique.*
5.10. Autoclave (destruction des parasites de quarantaine).
5.11. Lecteur ELISA.*

Et selon la méthode utilisée pour l'extraction :

➢ Broyage dans un sachet étanche

5.12. Broyeur à billes manuel, à moteur ou monté sur perceuse
5.13. Sachets de macération jetables, résistants (par exemple de type Stomacher®, de 105 mm x 150 mm).

➢ Presse à rouleaux

5.14. Presse à rouleaux cannelés ou lisses.

➢ Extracteur à fraise

5.15. Extracteur de jus végétaux à l'aide d'une fraise (Plant sap extractor).

6. Echantillons

6.1. Réception et stockage des "échantillons pour laboratoire"

Les échantillons pour laboratoire sont constitués de tubercules, fanes ou vitroplants.
Les tubercules sont stockés en chambre froide (5°C ± 4°C) ou à température ambiante hors gel, selon la durée prévue de conservation.
Les échantillons frais (fanes) doivent être conservés au frais au maximum 48 heures jusqu'à leur préparation et les vitroplants sont conservés en chambre climatisée.
Éviter tout risque éventuel de contamination de lot à lot (conditions de stockage en annexe V).

6.2. Préparation de "l'échantillon pour analyse"

6.2.1. Tubercules sans symptômes

Dans le cas d'échantillons constitués de tubercules, il est réalisé au préalable une levée de dormance par utilisation de gibbérelline afin d'accélérer et d'homogénéiser la germination. En effet, la répartition du parasite est aléatoire dans les tubercules et sa concentration peut être faible : le seuil de détection de la méthode ELISA peut ne pas être atteint. La mise en germination des tubercules va permettre la multiplication du ou des parasite(s) éventuellement présent(s).

Cette étape peut toutefois être évitée dans le cas de virus ayant des taux de multiplication importants dans le tubercule (PVX par exemple) ou dans le cas de tubercules à symptômes où l'analyse peut être effectuée directement sur ceux-ci (cf. § 6.2.2.).

- Laver les tubercules à l'eau courante [éventuellement additionnée d'un détergent et d'un désinfectant (p. ex. eau de Javel)] puis laisser sécher à l'air.
Dans la mesure où les tubercules sont propres, le lavage avant analyse peut être supprimé.

Pour chaque tubercule, procéder comme suit :

- Au moyen d'un scalpel, d'un couteau ou d'une cuillère à melon propre et désinfecté, prélever sur chaque tubercule la couronne ou une partie de celle-ci (la couronne est située à l'opposé du talon ou de la zone d'insertion du stolon) ou éventuellement au niveau du talon pour le PLRV; le prélèvement sera constitué d'au moins un oeil et fera 1 à 3 cm d'épaisseur. L'outil de prélèvement sera désinfecté entre chaque "échantillon pour laboratoire" soit en le trempant dans l'éthanol 70° ou un détergent de type DDN 50 puis dans l'eau, soit en stérilisant le scalpel par trempage dans l'éthanol à 70° suivi d'un séchage éventuel à la flamme, soit en le trempant dans une solution de Javel (1°Cl) puis dans l'eau.

- Les fragments de tubercules prélevés sont traités avec de l'acide gibbérellique 0,003 mM (annexe IV) afin d'obtenir une germination rapide et homogène. Ils sont immergés dans cette solution pendant 10 min minimum et à 16°C minimum. Un même bain de solution d'acide gibbérellique pourra être utilisé au maximum pour traiter 60 "échantillons pour laboratoire" dans la mesure ou ils ne présentent aucune pourriture. Les retirer du bain, les laisser sécher puis les disposer dans des bacs contenant un support de culture légèrement humide (par exemple de la vermiculite ou du terreau), les enfoncer légèrement afin d'éviter un dessèchement trop important. Un excès d'eau peut être préjudiciable à la conservation des couronnes (ou œilletons).

Eventuellement, traiter à l'aide d'un fongicide pour éviter certaines pourritures des couronnes.

- Mettre en germination à température ambiante.

a) Dans le cas des tests sur germes un obscurcissement temporaire éventuel favorise l'allongement des germes et facilite ainsi le broyage. Lorsque les germes ont atteint une longueur de 2-3 cm, les éclairer afin de favoriser la mise en évidence d'une éventuelle contamination. Veiller à maintenir le support de culture humide.

Après 3 à 5 semaines de culture, on prélève un germe sur chaque tubercule au moyen d'un scalpel ou d'un couteau propre et désinfecté. Une "prise d'essai" contient les germes issus de 1 à 5 tubercules. L'outil de prélèvement des germes (lame de scalpel ou couteau) sera désinfecté entre chaque échantillon pour laboratoire soit en le trempant dans l'éthanol 70° ou un détergent de type DDN 50 puis dans l'eau, soit en le stérilisant trempage dans l'éthanol à 70° suivi d'un séchage éventuel à la flamme, soit en le trempant dans une solution de javel (1°Cl) puis dans l'eau.

b) Dans le cas des tests sur feuilles, se reporter au 6.2.3.

6.2.2. Tubercules à symptômes

Prélever les tissus au niveau des symptômes.

6.2.3. Cas des feuilles, fanes et vitroplants

Cas des feuilles, des fanes ou de plantes entières : prélever au moins une foliole par fane ou par plante entière pour les analyses. Ces feuilles sont prélevées préférentiellement dans la moitié supérieure de l'appareil végétatif. Pour les échantillons de plus de 50 fanes, un groupage par 5 est possible pour le broyage.
Cas des vitroplants : "l'échantillon pour analyse" consiste en les vitroplants entiers (tiges + feuilles) sans les racines ni la gélose.

Cas d'analyses effectuées pour la détection de phytoplasmes : la "prise d'essai" se fera sur des racines ou des tissus vasculaires (tiges, pétioles).

6.2.4 Conservation

Il est possible de conserver (au maximum 1 mois) les prélèvements par congélation avant broyage.

6.3. Broyage

Selon la nature du matériel végétal utiliser un rapport poids de matériel végétal (en g) / volume de tampon d'extraction (en ml) de 1/5 à 1/10 pour les germes et les tubercules et de 1/0,2 à 1/10 pour les feuilles et vitroplants. Utiliser le tampon d'extraction décrit en annexe II sauf indication contraire du fournisseur. Dans tous les cas, utiliser le même ratio jus brut/tampon d'extraction pour les échantillons et pour les témoins.

Utiliser une des trois procédures suivantes :

6.3.1. Broyage avec un broyeur à billes (manuel, à moteur ou monté sur une perceuse)

- Rassembler le matériel végétal dans un sac plastique bien étanche, ajouter la quantité de tampon d'extraction nécessaire et effectuer le broyage. Conserver l'ensemble au réfrigérateur à 5°C ± 4°C jusqu'à la fin de l'analyse.

6.3.2. Broyage avec la presse à rouleaux

Les échantillons sont broyés en ajoutant la quantité de tampon nécessaire. Il faut s'assurer du bon nettoyage de la presse à rouleaux entre deux échantillons : faire un premier rinçage à l'eau courante afin d'éliminer tous les débris, puis on peut ajouter successivement par exemple détergent, eau courante, eau permutée et tampon d'extraction. Recueillir le broyat dans un tube et conserver au réfrigérateur à 5° ± 4°C.

6.3.3. Broyage avec l'extracteur à fraise

Se reporter au mode d'emploi du fournisseur concernant l'utilisation de l'extracteur à fraise.

Remarque : il est possible de clarifier les extraits obtenus : les laisser décanter de 2 h à une nuit à 5°C ± 4°C après broyage.

7. Mode opératoire

Rappel : afin d'éviter toutes contaminations, il est impératif de traiter séparément les échantillons et les témoins positifs ; ceci implique, notamment, des lieux de stockage et de manipulation séparés. Les témoins positifs sont traités de préférence en fin de série.

7.1. Echantillons de référence

Il est préférable que le matériel végétal utilisé pour la référence infectée (TM) soit de même nature et au même stade physiologique que les prises d'essai.
La **Référence non infectée** (TS) sera de même nature que l'échantillon à analyser.

7.2. Le plan de plaque

Des exemples de plans de plaque sont données en annexe VI.

Pour les volumes des dépôts suivre les préconisations des fournisseurs.

7.3. Déroulement du test

7.3.1. Dépôt de la première couche d'anticorps

- Incuber à T = 37° ± 3°C pendant 2 à 4 h.

7.3.2. Rinçage

- Faire au moins 2 lavages successifs de 2-3 minutes chacun avec du tampon de rinçage PBS-Tween (cf. annexe II).

7.3.3. Dépôt des échantillons

- Couvrir la plaque et incuber plus de 16 heures à 5°C ± 4°C ou 2 heures à 37°C ± 3°C.

7.3.4. Rinçage

- Un lavage optionnel à l'eau permutée ou sous robinet peut être pratiqué dans un premier temps.

- Faire au moins 3 lavages successifs de 2-3 minutes chacun au tampon de rinçage PBS-Tween. Dans le cas d'un lavage effectué avec un laveur de plaque le temps de rinçage peut être diminué à 3 x 10 secondes ou 3 x 8 secondes par plaque.

7.3.5. Dépôt de l'anticorps conjugué ou de l'anticorps de 2ème couche

- Incuber dans les conditions préconisées en 7.3.1.

7.3.6. Rinçage (idem 7.3.2)

7.3.7. Dépôt des anticorps de 3ème couche (TAS ELISA)

- Incuber dans les conditions préconisées en 7.3.1.

7.3.8. Rinçage (idem 7.3.2)

7.3.9. Dépôt du substrat

- Se référer aux préconisations du fournisseur. Préparer une quantité de substrat excédentaire de l'ordre de 5 à 10 ml afin d'observer son évolution à température ambiante pendant l'incubation des plaques.

- Incuber à température ambiante jusqu'à obtention de niveaux de D.O. satisfaisants pour les témoins.

8. Validation et interprétation des résultats

Pour valider chaque plaque, se référer à la Directive Générale (cf. § 0. Introduction et § 3.5.4).

Pour interpréter les résultats, se référer aux préconisations du fournisseur des réactifs sérologiques ou à la Directive Générale (cf. § 0. Introduction et § 3.5.4). Si le fournisseur n'indique pas de seuil, le seuil le plus fréquemment utilisé est de deux fois la moyenne des D.O. brutes des témoins sains calculée sur au moins 2 puits. Si pour des raisons particulières (nature de l'antiserum, du virus,…) ce seuil de positivité ne convient pas, le laboratoire utilisateur peut s'adresser au Laboratoire de référence qui lui donne, à titre indicatif, les seuils

qu'il a utilisés lui-même ou bien, il pourra prendre la méthode de calcul du seuil qu'il aura testé.

Les échantillons dont la D.O. brute est inférieure à ce seuil sont déclarés négatifs.

Les échantillons dont la D.O. brute est supérieure à ce seuil sont déclarés positifs.

Une attention particulière sera portée aux échantillons présentant des D.O. proches du seuil de positivité. Le responsable technique doit tout mettre en œuvre pour obtenir un résultat positif ou négatif (nouvelles analyses, nouveaux réactifs, confirmation dans un autre laboratoire…).

9. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par un tableau ou par une phrase du type :

Test ELISA négatif :

⇨ "***Virus ou phytoplasme x*** non détecté dans l'échantillon analysé par la technique ELISA".

Test ELISA positif :

⇨ Pour les organismes de quarantaine :

"***Virus ou phytoplasme x*** détecté dans l'échantillon analysé par la technique ELISA" pour les échantillons analysés sans groupage.

⇨ Pour les autres organismes nuisibles :

"***Virus ou phytoplasme x*** détecté sur l'échantillon analysé avec x % de contamination par la technique ELISA" pour les échantillons analysés par groupage. Les éléments nécessaires à l'obtention du pourcentage seront précisés (nombre de tests positifs, nombre de tests réalisés, importance du groupage).

Rappel réglementaire du Code rural, Titre V, Chapitre Ier Section 2 :
" Art. L. 951-6 - Toute personne qui, sur un fond lui appartenant ou cultivé par elle, ou sur des produits ou matières qu'elle détient en magasin, constate la présence d'un organisme nuisible, nouvellement apparu dans la commune, doit en faire immédiatement la déclaration soit au maire de la commune de sa résidence, lequel doit la transmettre au service chargé de la protection des végétaux, soit directement au service chargé de la protection des végétaux dont elle dépend."

10. Désinfection et destruction des déchets d'analyse

⇨ Matériel jetable et déchets obtenus lors de la préparation des échantillons : autoclavage, incinération ou désinfection à la Javel (1°Cl).

⇨ Matériel réutilisable (couteaux, éplucheurs, tubes,...) : désinfection à la Javel (1°Cl) et rinçage à l'eau avant réutilisation.

⇨ Matériel végétal non contaminé (pour les parasites de quarantaine) : déchetterie ou autre possibilité de destruction.

⇨ Matériel végétal douteux ou contaminés (pour les parasites de quarantaine) : autoclavage.

11. Annexes

Annexe I : Listes des virus et phytoplasmes de la pomme de terre répertoriés par l'Union Européenne (de quarantaine) et par d'autres organismes (organisme réglementé non de quarantaine, OEPP, parasite non réglementé)

Annexe II : Composition des tampons

Annexe III : Préparation de solutions d'alcool et d'eau de Javel au degré souhaité

Annexes IV : Préparation de la solution d'acide gibbérellique (0,003 mM)

Annexe V : Exigences relatives aux locaux de stockage des échantillons en cours d'analyse

Annexe VI : Plans de plaque : exemples

Annexe VII : Transmission des échantillons au(x) laboratoire(s) de confirmation

ANNEXE I

Listes des virus et phytoplasmes de la pomme de terre répertoriés par l'Union Européenne (de quarantaine) et par d'autres organismes (organisme réglementé non de quarantaine, OEPP, parasite non réglementé)

	Parasite de quarantaine pour l'Union Européenne ←		Organisme réglementé non de quarantaine ↑	OEPP →		Parasite non réglementé
	Annexe I A I	Annexe II AII		Liste A1	Liste A2	
Phytoplasmes						
Potato Stolbur phytoplasme		X			X	
Aster Yellow						
Potato Marginal Flavescence						X
Potato Phyllody						X
Potato Purple Toproll						X
Potato Witches'Broom						X
Potato Purple-top Wilt phytoplasme				X		
Virus						
Alfalfa Mosaic alfamovirus						
Andean Potato Latent tymovirus	X			X		
Andean Potato Mottle comovirus	X			X		
Arrachaca nepovirus B – Oca strain	X					
Beet Curly Top curtovirus						X
Cucumber Mosaic cucumovirus						X
Eggplant Mottled Dwarf nucleorhabdovirus						X
Potato Aucuba Mosaic potexvirus						
Potato Black Ringspot Nepovirus ou Tobacco Ringspot Nepovirus, potato calico strain	X			X		
Potato Deforming Mosaic begomovirus						X
Potato Latent carlavirus ou Red la Soda carlavirus						X
Potato Leaf Roll Virus (souche non européenne)	X					
Potato Leaf Roll Virus (souche européenne)			X			
Potato Mop-Top Pomovirus			X			
Potato Rough Dwarf carlavirus						X
Potato A Potyvirus (souche non européenne)	X					
Potato A Potyvirus (souche européenne)			X			
Potato M carlavirus (souche non européenne)	X					
Potato M carlavirus (souche européenne)			X			
Potato P carlavirus						X
Potato S carlavirus (souche non européenne)	X					
Potato S carlavirus (souche européenne)			X			
Potato T trichovirus	X			X		
Potato U nepovirus						X

Potato V potyvirus (souche non européenne)	X					
Potato V potyvirus (souche européenne)			X			
Potato X potexvirus (souche non européenne)	X					
Potato X potexvirus (souche européenne)			X			
Potato Y potyvirus (Y^0, Y^n et Y^c) (souche non européenne)	X					
Potato Y potyvirus (Y^0, Y^n et Y^c) (souche européenne)			X			
Potato Yellow Dwarf nucleorhabdovirus				X		
Potato Yellowing alfamovirus				X		
Potato Yellow Mosaic begomovirus						X
Potato Yellow Vein Disease				X		
Saq'O disease						X
Solanum Apical Leaf Curling begomovirus						X
Sowbane Mosaic sobemovirus						X
Tobacco Mosaic tobamovirus						X
Tobacco Necrosis Necovirus						X
Tobacco Rattle Tobravirus *			X			X
Tobacco Streak Ilarvirus						X
Tomato Black Ring nepovirus						X
Tomato Mosaic tobamovirus						X
Tomato Spotted Wilt tospovirus	X				X	
Wild Potato Mosaic potyvirus						X

* La détection par la technique ELISA est inappropriée pour ce virus.

← Directive 2000/29/CE du 8 mai 2000. La **partie A I** des annexes I et II concerne les organismes nuisibles inconnus dans la communauté, la **partie A II** des annexes I et II concerne les organismes nuisibles présents dans la communauté.

↑ **Organisme réglementé non de quarantaine** : organisme nuisible qui n'est pas un organisme de quarantaine, dont la présence dans les végétaux destinés à la plantation affecte l'usage prévu de ces végétaux, avec une incidence économique inacceptable et qui est donc réglementé sur le territoire de la partie contractante importatrice.

→ OEPP : Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes. **Liste A1** : organismes de quarantaine absents de l'ensemble de la région OEPP, **liste A2** : organismes de distribution restreinte à l'intérieur de la région OEPP.

ANNEXE II

Composition des Tampons

1 - Tampon de rinçage PBS-Tween :

COMPOSITION	Solution 1X
NaCl	8 g
KH_2PO_4	0,2 g
Na_2HPO_4, 12 H_2O	2,9 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml ou 22 gouttes
NaN_3 (facultatif)	0,2 g
Eau permutée	qsq 1 litre

Ajuster le pH à 7,4 ± 0,3 par addition de Na_2HPO_4, 12 H_2O pour l'augmenter et KH_2PO_4 pour le diminuer.

2 - Tampon de coating :

COMPOSITION	Solution 1X
Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
NaN_3 (facultatif)	0,2 g
Eau permutée	qsq 1 litre

Ajuster le pH à 9,6 ± 0,2 par addition de Na_2CO_3 pour l'augmenter ou de $NaHCO_3$ pour le diminuer.

3 - Tampon d'extraction :

COMPOSITION	Solution 1X
PBS Tween	1 litre
PVP = Polyvinylpyrrolidone	20 g

Dans le cas des analyses sur tubercules et germes ajouter :

Ovalbumine	10 g

Veiller à la complète dissolution du PVP et de l'ovalbumine.

4 - Tampon conjugué :

COMPOSITION	Solution 1X
PBS Tween - PVP	18 ml
Gélatine stérile à 5%	2 ml

ou

Ovalbumine	0,072g (4 g/L)

5 - Tampon de substrat :

COMPOSITION	Solution 1X
Diéthanolamine	97 ml
NaN_3 (facultatif)	0,2 g
Eau permutée	903 ml

Ajuster le pH à 9,8 ± 0,2 avec HCl. Attention, une grande quantité HCl est nécessaire, ajuster le pH et compléter le volume ensuite dans une éprouvette. Conserver de préférence à l'obscurité.

ANNEXE III

Préparation d'un litre d'alcool à 70°GL

Alcool utilisé en stock dosant K °GL

Alcool à préparer au taux de 70 °GL

Formule de calcul pour préparer 1 litre d'alcool à 70 °GL :

Quantité d'alcool stock : V=70/K (en litre)

Quantité d'eau à ajouter : compléter à 1 litre avec de l'eau permutée

Volume final préparé : 1 litre

Exemple :

Stock à 96 °GL

Volume d'alcool stock : 70/96 = 0,73 litre d'alcool à 96°GL à compléter à 1 litre avec de l'eau permutée

Préparation d'un litre d'eau de Javel à 1 degré chlorométrique

Eau de Javel utilisée en stock dosant J degré chlorométrique

(Les teneurs habituelles sont de 48 degrés chlorométriques pour les concentrés ou de 12 degrés chlorométriques pour des semi-concentrés).

Formule de calcul pour préparer 1 litre d'eau de Javel à 1 degré chlorométrique :

Quantité d'eau de Javel stock : V=1/J (en litre)

Quantité d'eau à ajouter : compléter à 1 litre avec de l'eau permutée

Volume final préparé : 1 litre

Exemple :

Stock de Javel à 48 degrés chlorométrique

Volume de Javel concentré : 1/48 = 0,021 litre de Javel concentré à 48 degrés chlorométrique à compléter à 1 litre avec de l'eau permutée pour obtenir de l'eau de Javel à 1 degré chlorométrique.

ANNEXE IV

Préparation de la solution d'acide gibbérellique (0,003 mM)

COMPOSITION	1X
Acide gibbérellique	1 mg
Eau permutée	qsq 1 litre

Une solution stock concentrée peut éventuellement être préparée avec une durée de conservation maximum de 1 semaine (à température ambiante).

ANNEXE V

Exigences relatives aux locaux de stockage des échantillons en cours d'analyses

1 - Cas des tubercules

- Stockage au sec dans des locaux ventilés.
- Température ambiante ou réfrigérée hors gel, selon la durée prévue.
- Éviter tout risque éventuel de contamination de lot à lot.

2. Cas des fanes de pomme de terre

- Températures de 5°C ± 4°C ou, à défaut à l'abris de la chaleur.
- Traitement rapide de l'échantillon.

ANNEXE VI

Plan de plaque : exemples

Plan recommandé par la Directive Générale :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			1	TS	6	9	11	13	23	19	24	
C			1	TS	6	9	11	13	23	19	24	
D			2	4	Ta	21	12	14	17	22	7	
E			2	4	Ta	21	12	14	17	22	7	
F			3	5	8	10	TC	15	18	20	16	
G			3	5	8	10	TC	15	18	20	16	
H												

Autre plan de plaque possible :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1	4	34	6	34	13	31	19	24	28	
B		1	4	34	6	34	13	31	19	24	28	
C		25	35	11	9	27	14	23	22	7	5	
D		25	35	11	9	27	14	23	22	7	5	
E		36	12	Ta	21	TC	15	17	20	33	TS	
F		36	12	Ta	21	TC	15	17	20	33	TS	
G		3	2	8	10	29	30	18	32	16	26	
H		3	2	8	10	29	30	18	32	16	26	

Ta : témoin tampon (2 puits)
TS : témoin sain (2 puits)
TC : Témoin contaminé (2 puits)
N°1 à 27 : échantillons

Eau permutée (bordure)

Témoin blanc, substrat (zéro D.O.) à remplir d'eau à chaque étape sauf à la dernière où ils seront remplis de substrat.

Bordures : à remplir d'eau permutée à chaque étape du test

Ta, TS et TC sont répartis aléatoirement sur la plaque ; ils recevront tous les produits comme les échantillons sauf à l'étape du dépôt des extraits végétaux :

- le témoin Ta recevra du tampon d'extraction sans extrait végétal
- le témoin contaminé TC recevra de l'extrait végétal issu d'une plante reconnue infectée
- le témoin sain recevra de l'extrait végétal issu d'une plante reconnue saine

ANNEXE VII

Transmission des échantillons au(x) laboratoire(s) de confirmation

Dans le cas des virus de quarantaine de l'Union Européenne où le test ELISA est dit positif, des analyses complémentaires peuvent être réalisées sur l'échantillon conservé au frais et non broyé au laboratoire de confirmation Virologie « Pomme de Terre » (la Station Quarantaine Pomme de Terre – Le Rheu). Une fiche de renseignements accompagne l'échantillon.

Avertissement : il convient de garder et de conserver dans des conditions appropriées l'échantillon pour analyse (lorsqu'il s'agit de tubercules) ou l'échantillon pour laboratoire (pour les plants) :

- au moins jusqu'à l'achèvement de la méthode de confirmation en question,
- au mieux, si possible, durant 1 mois à partir de l'obtention du premier résultat nécessitant confirmation.

Conditions d'envoi au laboratoire de confirmation

Les échantillons seront identifiés et accompagnés d'une fiche de renseignements. Ils seront enveloppés dans un emballage étanche, transmis par un moyen de transport rapide (collissimo ou chronopost ou autre) et dans des conditions adaptées, à une température aussi basse que possible mais sans congélation (emballage isotherme de préférence, avec système rafraîchissant).

Matériel à envoyer : échantillon conservé au frais et non broyé.

Adresse du laboratoire de confirmation « Pomme de Terre » :

L.N.P.V. / STATION QUARANTAINE POMME DE TERRE
LA MOTTE AU VICOMTE
35650 LE RHEU
☎ 02.23.48.51.15
Fax 02.23.48.51.19
E-Mail : srpv-lnpv-sqpdt.draf-bretagne@agriculture.gouv.fr